



Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa  
Trabalho Final de Mestrado Integrado em Medicina

## **ESPETRO CLÍNICO DA LINFOCITOSE CD8**

Estudo baseado num caso clínico

Pedro Alexandre Silva Gaspar

Orientador: Dr. Válder Fonseca

Coordenador: Prof. Doutor Rui Vitorino

Clínica Universitária de Medicina II

2015/2016

## RESUMO

**Introdução:** A linfocitose CD8 persistente é um achado hematológico raro, sobretudo em doentes sem infecção por VIH. Nas situações de estimulação antigénica crónica os linfócitos CD8<sup>+</sup> adquirem alterações fenotípicas distintas, embora o seu significado biológico, relevância clínica e abordagem não estejam bem estabelecidos.

**Caso Clínico:** Mulher de 50 anos, sem antecedentes relevantes, admitida por fadiga, sudorese noturna e hepatomegalia, associados a linfocitose CD8, colestase hepática sem hiperbilirrubinémia, e elevação da enzima de conversão da angiotensina. Após a biópsia hepática ter identificado granulomas epitelioides foi assumido o diagnóstico de Sarcoidose, após exclusão de patologia infecciosa, autoimune e neoplásica. Apesar da melhoria inicial sob corticoterapia, assistiu-se a recorrência do quadro. Nesta altura a imunofenotipagem do sangue periférico mostrou uma população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>. A repetição da biópsia osteomedular mostrou infiltração linfocitária por células CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> e grânulos citotóxicos. No estudo das populações linfocitárias observou-se uma expansão de células memória-efetoras, não *terminalmente-diferenciadas*, com uma distribuição oligoclonal das famílias Vβ e depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com fenótipo naïve, e de linfócitos B CD19<sup>+</sup>. Foi considerado o diagnóstico diferencial entre Leucemia de Grandes Linfócitos Granulares (L-GLG) de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e Imunodeficiência Primária.

**Conclusão:** A linfocitose CD8 pode ser o único parâmetro laboratorial disponível para conduzir uma investigação etiológica. As entidades clínicas habitualmente associadas a linfocitose CD8 podem não ser suficientes para explicar todos os casos, sobretudo em doentes sem infecção VIH, mas estes casos podem conduzir ao desenvolvimento de novas hipóteses científicas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Persistent CD8 lymphocytosis is a rare hematologic condition, especially in patients without HIV infection. In chronic antigenic stimulation, CD8<sup>+</sup> lymphocytes acquire distinct phenotypic changes, although their biological significance, clinical relevance and approach are not well established.

**Case Report:** 50 year old woman, without relevant clinical history, admitted with fatigue, night sweats, hepatomegaly associated with lymphocytosis CD8<sup>+</sup>, hepatic cholestasis without hyperbilirubinemia and elevated angiotensin converting enzyme. The diagnosis of Sarcoidosis was made after the identification of epithelioid granulomas on the liver biopsy and after the exclusion of infectious, autoimmune and neoplastic diseases. Despite initial improvement under corticosteroid therapy, the disease recurred. At this time, immunophenotyping of peripheral blood showed a population of CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> T lymphocytes. Repetition of osteomedular biopsy showed lymphocytic infiltration of CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> and cytotoxic granules. In the study of lymphocyte populations, we observed an expansion of effector memory cells, non *terminally-differentiated*, with oligoclonal distribution of Vβ families and depletion of T lymphocytes CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> with naïve phenotype, and CD19<sup>+</sup> B lymphocytes. It was considered the differential diagnosis of CD8<sup>+</sup> T cell Large Granular Lymphocyte Leukemia and Primary Immunodeficiency.

**Conclusion:** The CD8 lymphocytosis may be the only laboratory parameter available to conduct an etiological research. Clinical entities typically associated with CD8 lymphocytosis may not be sufficient to explain all cases, especially in patients without HIV infection, but these cases can lead to the development of new scientific hypotheses.

## INTRODUÇÃO

A expansão crónica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (linfocitose CD8) é um achado hematológico raro mas descrito em vários contextos clínicos, nomeadamente neoplasias, doenças autoimunes, infeções crónicas, imunodeficiências primárias e também no envelhecimento.<sup>1,2</sup> A linfocitose CD8 nestes casos resulta da expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, grandes e granulares, com um fenótipo *terminalmente-diferenciado* (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) e com restrição oligoclonal das cadeias V $\beta$  do recetor de células T (TCR).<sup>1</sup> Estas características sugerem que, nestas condições, existe um processo de estimulação linfocitária dirigido por antígenos.<sup>1-4</sup> O conhecimento das vias de diferenciação dos linfócitos CD8<sup>+</sup> durante a estimulação antigénica crónica (**Figura 1**) é crucial na interpretação e investigação etiológica dos casos de linfocitose T CD8<sup>+</sup>.<sup>1,2</sup> Durante a estimulação antigénica, as células T CD8<sup>+</sup> *naïve* (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) sofrem proliferação e diferenciação e evoluem para populações de células diferenciadas dirigidas ao antígeno.<sup>1,3</sup> Após a cessação do estímulo antigénico, alguns destes linfócitos sofrem apoptose, enquanto outros persistem com fenótipo memória.<sup>3</sup> Nos casos de estimulação antigénica persistente, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> sofrem modificações fenotípicas e funcionais originando populações de células *terminalmente-diferenciadas*, com resistência à apoptose, atividade efetora citotóxica (grânulos de perforina, granzima e granolisina) ou imunossupressora.<sup>1,4</sup>

O significado biológico e a relevância clínica, sobretudo no diagnóstico diferencial e na decisão terapêutica, da linfocitose CD8 nas entidades clínicas em que está descrita, é pouco claro, o que talvez justifique a ausência de algoritmos clínicos detalhados que orientem a investigação destes casos. Apesar de a linfocitose CD8 não dominar habitualmente nenhuma entidade específica existem algumas doenças onde este achado é a principal alteração encontrada, como na L-GLG<sup>5-7</sup> de linfócitos T e na Síndrome de Infiltração Linfocitária difusa (SILD).<sup>2,8</sup>

Mais recentemente a linfocitose CD8 tem também sido estudada como fator prognóstico.<sup>1,3,9</sup> Este fenótipo imunológico é designado de Fenótipo Imunológico de Risco<sup>1,3,9</sup> e demonstra a importância crescente da compreensão dos mecanismos imunológicos da expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na patologia humana.<sup>1</sup>

Neste trabalho apresenta-se um caso clínico em que se orientou a investigação etiológica com base no diagnóstico diferencial da linfocitose CD8. As particularidades deste caso demonstram a importância crescente da articulação entre a Medicina Clínica e a Investigação Científica, como solução para problemas clínicos de maior complexidade.

## **CASO CLÍNICO**

M.J.G.T.C, sexo feminino, 50 anos, caucasiana, natural de Vila Viçosa e residente em Serpa. Casada. Doméstica. Independente nas atividade de vida diária.

### **História da Doença Atual**

Doente assintomática até 2011 quando inicia paulatinamente fadiga, sem predomínio circadiário, sudação noturna e desconforto incaracterístico no quadrante abdominal superior direito, acompanhada de metrorragias. A doente recorreu ao seu médico assistente que, após observação clínica, solicitou avaliação laboratorial. Na avaliação laboratorial foi documentada anemia microcítica com cinética do ferro compatível com anemia ferropénica, linfocitose relativa e absoluta, e colestase hepática sem hiperbilirrubinémia. Por esta razão, foi pedida endoscopia digestiva alta (EDA), colonoscopia e TC tóraco-abdominal. A EDA e a colonoscopia não mostraram alterações, pelo que a anemia ferropénica foi atribuída à Leiomiomatose Uterina (com metrorragias) que a doente apresentava desde 2010. A TC tóraco-abdominal mostrou uma volumosa hepatomegália com extensão até às cristas ilíacas, homogénea, sem nodularidade, e adenomegalias adjacentes ao tronco celíaco, hilo hepático e em localização lombo-aórtica. Tendo em conta estes achados, foi realizada biópsia hepática e ganglionar, por via laparoscópica, que mostrou parênquima hepático difusamente infiltrado por elementos linfóides sem atipias evidentes, com formação de centros germinativos, alguns espaços porta envolvidos por reação inflamatória, sem fibrose, e pesquisa de substância amiloide negativa. A biópsia dos gânglios linfáticos do hilo hepático mostraram tecido ganglionar hipertrófico, com presença de centros germinativos e proliferação histiocítica intensa, predominantemente com imunofenótipo T (CD3<sup>+</sup>), numerosos plasmócitos, sem atipias. Não foram observadas células neoplásicas no líquido ascítico colhido durante a laparoscopia.

A suspeita de uma doença sistémica caracterizada por linfocitose e hepatomegalia com infiltrado linfoplasmocitário inespecífico motivou a referência da doente à consulta de Medicina Interna do Centro Hospitalar Lisboa Norte - Hospital Santa Maria, onde foi proposto o internamento eletivo para investigação etiológica.

Como **antecedentes pessoais** destaca-se Dislipidémia desde 2011, não medicada, mas controlada com alterações do estilo de vida, e Leiomiomas Uterinos, diagnosticados em 2010. Doente em perimenopausa, com história obstétrica de duas gestações e dois partos de termo (G2P2, 2PTE) sem complicações. A doente não apresentava hábitos tabágicos, alcoólicos ou toxicófilos, nem história epidemiológica relevante. Na **história familiar** apurou-se que o pai faleceu por cirrose hepática não-alcoólica, aos 50 anos, não sendo possível a caracterização da causa da cirrose, e a mãe faleceu por neoplasia gástrica, aos 68 anos. A doente nega relações de consanguinidade ou doenças heredofamiliares conhecidas.

### **Medicação Habitual**

Sulfato Ferroso 80mg 1id; Harmonet® 1id. Não tinha história de alergias medicamentosas ou outras.

### **Exame Objetivo**

Doente com bom estado geral, idade aparente coincidente com a real, vigil, orientada e colaborante. Temperatura timpânica 36,0°C. Hemodinamicamente estável, com tensão arterial de 110/60mmHg. Frequência cardíaca: 78bpm, com pulso radial regular, simétrico e amplo. Eupneica em repouso, com SatO<sub>2</sub> 93% em ar ambiente. Mucosas coradas e hidratadas. Anictérica e acianótica. Sem adenomegalias periféricas palpáveis. Auscultação cardíaca: S1 e S2 presentes, rítmicos e normofonéticos, sem sopros ou extrassons. Auscultação pulmonar: murmúrio vesicular mantido e simétrico, sem ruídos adventícios. Abdómen plano, com presença de estrias periumbilicais; ruídos hidro-aéreos presentes, com timbre e frequência normal, sem sopros; hepatomegália dolorosa palpável a 7cm do rebordo costal inferior direito, com bordo regular, sem outras massas ou organomegalias, sem reação peritoneal. Membros, pele e faneras sem alterações. Sem alterações do aparelho osteoarticular. Exame neurológico sem alterações.

A **avaliação analítica** inicial mostrou: Hb 10,9g/dL; Htc 32,3%; VGM 72,5 fL; RDW 15,8%; Leucócitos 12400x10<sup>6</sup>/L; Neutrófilos 20,9% (2590 x10<sup>6</sup>/L); Linfócitos 73,7% (9140 x10<sup>6</sup>/L); Plaquetas 383000 x10<sup>6</sup>/L; Ferro 36ug/dL; CTFF 542up/dL; Sat. Transferrina 7%; Ferritina 75,6ng/dL; INR 0,88; APTT 26,3/29,0s; Ureia 31mg/dL; Creatinina 0,81mg/dL; Na<sup>+</sup> 142mEq/L; K<sup>+</sup> 4,5mEq/L; Ca<sup>2+</sup> 10,5mg/dL; Albumina 4,1;

ALT 24U/L; AST 50U/L;  $\gamma$ GT 123U/L; Fosfatase Alcalina 383U/L; Bilirrubina total 0,46mg/dL; Bilirrubina direta 0,19mg/dL; VS 18; LDH 693U/L (**Anexo 1**).

### **Discussão Diagnóstica e Investigação Adicional**

O quadro de fadiga e hepatomegália com linfocitose e colestase hepática sem hiperbilirrubinemia foram abordados de acordo com as seguintes hipóteses diagnósticas:

a) Doença Linfoproliferativa, b) Doença Granulomatosa e c) Doença Autoimune.

Do ponto de vista analítico foram excluídas as causas metabólicas de doença hepática crônica, não foram documentados autoanticorpos (nomeadamente ANA, Anti-LKM, ASMA e AMA) sugestivos de Doença Autoimune Sistêmica, as serologias para os principais agentes microbiológicos foram também negativas, nomeadamente para infecção VIH, VHB, VHC, EBV, CMV e *M. tuberculosis*, encontrando-se apenas elevado o valor da enzima de conversão da angiotensina (ECA) (102U/L) (**Anexo 2**). A imunofenotipagem do sangue periférico mostrou uma inversão do ratio  $CD4^+/CD8^+$  ( $CD4^+$ : 1971 células/ $\mu$ L, 23,8% e  $CD8^+$ : 5562 células/ $\mu$ L, 67,1%), documentando uma linfocitose  $CD8^+$  sem fenótipo aberrante. Foi realizado um mielograma que mostrou medula normocelular, sem desvio da relação mieloide/eritroide, com 26% de linfócitos, sem atipias celulares. Foi ainda realizada broncofibroscopia que não mostrou alterações, nomeadamente, nas biopsias brônquicas ou na avaliação citoquímica do lavado bronco-alveolar. A cultura do lavado bronco-alveolar em meio de *Löwenstein-Jensen* foi negativa para *M. tuberculosis*.

A investigação realizada permitiu a exclusão de Doença Linfoproliferativa, bem como de uma causa infecciosa para o quadro clínico. A hipercalcemia, embora sem hipercalcúria, associada à elevação significativa dos valores da ECA sugeriam a hipótese de Doença Granulomatosa, nomeadamente Sarcoidose. Dada esta hipótese diagnóstica a biopsia hepática foi revista e, concordantemente, foi encontrado um denso infiltrado linfocitário T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  com esboço de granulomas epitelioides, sem atipias citológicas ou necrose (**Figura 2**). A pesquisa de infecção por CMV (por imunohistoquímica) e EBV (por “hibridação in situ”) foi negativa (**Anexo 2**).

Foi assumido o diagnóstico de **Sarcoidose Hepática**, apesar da linfocitose periférica  $CD8^+$  e do predomínio de linfócitos  $CD8^+$  no infiltrado hepático não serem achados conhecidos desta entidade. Contudo, não foi encontrada uma etiologia alternativa para



esta alteração hematológica e, com a exclusão de malignidade, foi decidido manter vigilância relativamente a esta alteração e iniciar terapêutica para a Sarcoidose.

### **Seguimento e Evolução**

A doente teve alta e iniciou terapêutica com Prednisolona 40mg/dia. Durante o *follow-up*, assistiu-se a melhoria sintomática, com melhoria do cansaço e diminuição da hepatomegália, bem como das alterações analíticas, verificando-se resolução da linfocitose (para  $3140 \times 10^6$  linfócitos/L) e normalização dos valores da ECA (para 10U/L), após dois meses de corticoterapia (**Figura 3**). Aproximadamente três meses depois, dada a estabilidade clínica, iniciou-se desmame progressivo da corticoterapia. Contudo, nos meses seguintes verificou-se o reaparecimento do cansaço, da sudorese noturna, da hepatomegália e da linfocitose associada a colestase hepática (**Figura 3**).

Nesta altura, dado o reaparecimento da linfocitose  $CD8^+$  foi reequacionado o diagnóstico da doente. A imunofenotipagem de sangue periférico mostrou manutenção da inversão do ratio  $CD4^+/CD8^+$  ( $CD4^+$ : 759,3/ $\mu$ L, 15,5% e  $CD8^+$ : 3300,0/ $\mu$ L, 67,2%). A repetição da biópsia osteomedular mostrou evolução da infiltração linfocitária agora constituída por linfócitos positivos para CD8, CD3, CD5, CD57, e grânulos citotóxicos (T-cell Intracellular Anigen-1 (TIA-1) e granzima), por imunohistoquímica, apesar de não serem evidentes atipias celulares. A imunofenotipagem do sangue medular identificou uma população linfóide T com imunofenótipo  $CD3^+CD2^+CD5^+$  com inversão da relação  $CD4^+/CD8^+$ . A TC tóraco-abdómino-pélvica não revelou alterações *de novo*, mantendo-se a hepatomegália homogénea. A EDA e a colonoscopia voltaram a excluir patologia maligna do tubo digestivo, tendo-se documentado a presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário inespecífico nas biópsias do duodeno e cólon.

Foi adicionalmente realizado um estudo das populações linfocitárias por citometria de fluxo (CF) do sangue periférico que mostrou linfocitose  $CD8^+$ , sem expansão de células  $T\gamma\delta$ , com expansão de células memória-efetoras, mas não *terminalmente-diferenciadas*, e com uma distribuição das famílias V $\beta$  sugestivas de restrição oligoclonal. O estudo das restantes populações mostrou uma depleção de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  com fenótipo naïve, com um número normal de linfócitos T  $CD4^+FoxP3^+CD25^+$  e uma depleção de linfócitos B  $CD19^+$  (**Figura 4**).

Foi considerado o diagnóstico diferencial entre **L-GLG de linfócitos T CD8<sup>+</sup>** e **Imunodeficiência Primária de Início Tardio**, aguardando-se os resultados da sequenciação genómica de genes de interesse habitualmente implicados em Imunodeficiências Primárias de Início Tardio. Foi decidida a manutenção da vigilância clínica quanto à hipótese diagnóstica de Leucemia LGL dado não ser possível a confirmação deste diagnóstico e não ter sido encontrado nenhum critério que tornasse mandatória a instituição de terapêutica dirigida.

## DISCUSSÃO

A linfocitose absoluta T CD8<sup>+</sup> é um achado hematológico raro cujo diagnóstico diferencial pode ser particularmente complexo, especialmente em doentes sem infecção VIH. O estudo deste caso clínico demonstra a necessidade de compreender os mecanismos imunológicos da expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em vários contextos clínicos.

### **Sarcoidose Hepática**

A Sarcoidose é uma doença granulomatosa sistêmica de causa desconhecida que afeta principalmente indivíduos com menos de 40 anos, (pico de incidência entre os 20 e os 29 anos), atingindo maioritariamente indivíduos do sexo feminino.<sup>10</sup> A sua patogénese não está completamente esclarecida, mas alguns microrganismos têm sido apontados como potenciais agentes etiológicos. Pensa-se que num contexto genético de suscetibilidade, uma resposta imunológica não apropriada contra um agente infeccioso possa culminar no desenvolvimento da doença.<sup>10,11</sup> Do ponto de vista histológico caracteriza-se pela formação de granulomas epitelioides não caseosos em vários tecidos, sendo o pulmão e os gânglios linfáticos os locais mais afetados.<sup>12</sup> O diagnóstico de Sarcoidose baseia-se na presença de sinais e sintomas classicamente associados à doença quando acompanhados de demonstração histológica de granulomas, após exclusão dos respetivos diagnósticos diferenciais.<sup>10,13</sup>

As manifestações extrapulmonares são frequentes mas ocorrem isoladamente (do envolvimento torácico) em apenas 2% dos doentes.<sup>12</sup> O envolvimento hepático é frequente na Sarcoidose, mas é igualmente raro isoladamente.<sup>12,14,15</sup> Cerca de 50 a 65% dos doentes apresentam granulomas hepáticos assintomáticos, sendo também detetadas alterações assintomáticas das provas hepáticas em 35% dos casos.<sup>12</sup> Os corticoides continuam a ser a terapêutica de primeira linha<sup>14</sup>, apesar de se verificar remissão espontânea do envolvimento hepático em cerca de 75%.<sup>12</sup>

No caso apresentado a hipótese de Sarcoidose foi colocada com base na presença de cansaço e de hepatomegália associados a padrão colestático sem hiperbilirrubinémia, elevação da ECA, hipercalcémia ligeira e granulomas hepáticos. Contudo, desde a apresentação clínica que alguns achados eram difíceis de integrar nesta entidade

nomeadamente a ausência de envolvimento torácico concomitante, a distribuição linfocitária nos granulomas hepáticos e a presença de linfocitose CD8<sup>+</sup>.

A sarcoidose é a causa não infecciosa mais frequentemente associada a granulomatose sistémica.<sup>13</sup> Os granulomas da sarcoidose apresentam uma distribuição característica dos linfócitos T: os linfócitos T CD4<sup>+</sup> encontram-se difusamente distribuídos por todo o granuloma e os linfócitos T CD8<sup>+</sup> encontram-se apenas, e em menor quantidade, na zona externa.<sup>10,16</sup> *Kita et al*<sup>16</sup> defende que esta distribuição é feita por camadas funcionalmente relacionadas, assim, se os linfócitos T CD4<sup>+</sup> presentes na região interna são predominantemente efetores (CD45RO<sup>+</sup>), os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, em conjunto com linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> encontram-se na região externa. Nesta doente o estudo imunohistoquímico dos granulomas hepáticos revelou a presença de abundantes linfócitos T CD45RO<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na periferia e no centro do granuloma, um achado que não é habitual num granuloma sarcoide.

A leucopénia com linfopénia é o achado hematológico mais frequente na Sarcoidose (sobretudo nas fases crónicas da doença), ocorrendo em aproximadamente 40% dos casos, que se deve à redistribuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> pelos tecidos mais envolvidos (*homíng*).<sup>10,12</sup> Na revisão da literatura apenas um caso descreve um doente com Sarcoidose e Linfocitose, mas sem caracterização imunofenotípica e com um ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> normal.<sup>17</sup> No caso apresentado, a presença de linfocitose CD8<sup>+</sup> é particularmente notória porque questiona o diagnóstico de Sarcoidose.

Outro aspeto que questiona o diagnóstico de Sarcoidose é a evolução clínica da doente. Geralmente assiste-se a melhoria clínica e laboratorial (incluindo as manifestações hematológicas como mostra *Inbal et al*<sup>17</sup>) ao longo do seguimento clínico. Neste caso apesar da melhoria clínica e laboratorial durante os primeiros meses de terapêutica verificou-se, durante o desmame da corticoterapia, o reaparecimento dos sintomas e das alterações laboratoriais (**Figura 3**), o que implica a investigação adicional dos diagnósticos diferenciais de Sarcoidose.<sup>10,13</sup>

O quadro clínico da doente foi então orientado para os dois principais problemas identificados: a) granulomas epitelióides hepáticos com infiltrado CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e b) linfocitose CD8<sup>+</sup>.

## **Granulomatose Hepática**

Os granulomas são lesões constituídas por agregados epitelioides de histiócitos, células gigantes multinucleadas e linfócitos.<sup>14</sup> Podem ser encontrados em inúmeras patologias e representam uma resposta imunitária dirigida a um alvo específico. As suas causas incluem doenças infecciosas (mais frequentes<sup>10</sup>), autoimunes, neoplásicas (sobretudo Doenças Linfoproliferativas), as imunodeficiências (primárias) e a Sarcoidose.

As características histológicas dos granulomas hepáticos neste caso, e conforme referido, não são coincidentes com as esperadas na Sarcoidose. A presença de granulomas com infiltração por linfócitos CD8<sup>+</sup> sugere, pelo contrário, uma causa infecciosa ou a infiltração tecidual secundária a uma expansão sistémica de linfócitos CD8<sup>+</sup> como acontece em casos de Doença Linfoproliferativa ou de Imunodeficiências Primárias, nomeadamente na Imunodeficiência Comum Variável e na Imunodeficiência Combinada Grave.<sup>18</sup>

A exclusão de causas infecciosas (**Anexo 2**) favorece, por isso, as hipóteses de Doença Linfoproliferativa ou de Imunodeficiência Primária.

## **Linfocitose T CD8<sup>+</sup>**

A linfocitose (contagem de linfócitos no sangue periférico superior a  $4000 \times 10^6$  linfócitos/L)<sup>19</sup> é um achado hematológico frequente sobretudo em crianças.<sup>13</sup> A linfocitose representa habitualmente a expansão de uma ou mais populações de linfócitos, podendo corresponder a expansões de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) ou células NK (CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>). A linfocitose T CD8<sup>+</sup> é a mais rara e resulta da expansão transitória desta população, em situações de infeção viral, ou da expansão crónica de linfócitos CD8<sup>+</sup>, como no envelhecimento, infeções crónicas, alcoolismo, transplantação, doenças autoimunes e neoplasias.<sup>1</sup> Nestes casos os linfócitos, designados grandes linfócitos granulares (GLG), pelas suas características morfológicas, são células *terminalmente-diferenciadas*, caracterizadas pela expressão de CD57 e restrição oligoclonal das cadeias V $\beta$  do TCR.<sup>1,2</sup> As vias de diferenciação dos linfócitos CD8<sup>+</sup> durante a estimulação antigénica crónica são complexas e ainda pouco estudadas. Contudo, o conhecimento sobre estes fenómenos imunológicos é crucial na investigação etiológica dos casos de linfocitose CD8<sup>+</sup>.

Em situações fisiológicas, durante a estimulação antigénica as células T CD8<sup>+</sup> *naïve* (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>)<sup>1,3</sup> sofrem um processo sequencial de diferenciação (**Figura 1**). O estágio inicial é caracterizado por linfócitos T *inicialmente-diferenciados* (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD57<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) que sofrem apoptose após a cessação do estímulo antigénico. Contudo, uma fração desta população pode persistir com um fenótipo memória.<sup>3</sup> Nos casos de estimulação antigénica persistente os linfócitos CD8<sup>+</sup> podem sofrer modificações fenotípicas e funcionais, com perda progressiva da expressão de CD28 e aquisição da expressão de CD57, evoluindo para um estágio *intermediamente-diferenciado* (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>CD45RA<sup>+/-</sup>) e posteriormente para um estágio *terminalmente-diferenciado* (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>).<sup>1,4</sup> Os linfócitos *terminalmente-diferenciados* são resistentes à apoptose e podem apresentar atividade efetora, citotóxica (com expressão de perforina, granzima e granolisina) e/ou imunossupressora.<sup>1</sup> Durante este processo os linfócitos CD8<sup>+</sup> *terminalmente-diferenciados* apresentam senescência replicativa com diminuição da atividade da telomerase.<sup>1,3</sup> Para além destas alterações sequenciais, a estimulação antigénica persistente constitui também uma pressão seletiva sobre os clones de linfócitos CD8<sup>+</sup> que evoluem com restrição progressiva do repertório do TCR.<sup>1</sup>

As condições clínicas mais frequentemente associadas à expansão oligoclonal destas subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> são: a) neoplasias, b) doenças autoimunes, c) infeções virais crónicas/latentes, nomeadamente a infeção pelo VIH, d) algumas imunodeficiências, e e) o processo de envelhecimento.

Alguns casos de Melanoma, Carcinoma do Pulmão, Carcinoma de Células Renais, Doenças Linfoproliferativas, Leucemia Mieloide Aguda e Síndromes Mielodisplásicas estão associados a um aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> *terminalmente-diferenciados*.<sup>1,2</sup> Para além destas associações de relevância clínica controversa, a expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> pode adquirir um comportamento maligno, constituindo uma entidade neoplásica específica, denominada Leucemia GLG de células T (ver abaixo).

Algumas doenças autoimunes são também acompanhadas por um aumento das populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, como por exemplo, a Esclerose Múltipla, a Diabetes Mellitus tipo 1, a Doença de Graves, a Artrite Reumatoide, e o Lúpus Eritematoso Sistémico.<sup>1</sup>

Apesar das infeções por CMV e EBV serem as mais associadas a expansões oligoclonais de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, este processo imunológico também está descrito em

indivíduos infetados com VIH, VHC e Parvovirus B19.<sup>1</sup> Nas infeções virais crónicas o papel imunopatogénico destas populações linfocitárias parece ser bivalente. Por um lado desempenham respostas citotóxicas antivirais, mas por outro podem explicar, pela senescência replicativa e restrição do repertório do TCR, o aumento da incidência de infeções oportunistas nestes doentes.<sup>1</sup> A infeção pelo VIH é um dos casos mais bem estudados de expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>.<sup>1,2</sup> A expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> ocorre principalmente na fase de infeção aguda e tende a diminuir gradual e paralelamente à diminuição das células T CD4<sup>+</sup>.<sup>1,2,8</sup> No entanto, segundo *Ghrenassia et al.*, em 0,3 a 4,6% dos doentes verifica-se linfocitose T CD8<sup>+</sup> persistente, com infiltração de órgãos e tecidos, uma entidade clínica designada Síndrome da Infiltração Linfocitária Difusa (SILD).<sup>2,8</sup>

Tal como referido, algumas Imunodeficiências Primárias podem acompanhar-se de linfocitose T CD8<sup>+</sup>.<sup>20</sup> Recentemente foram descritos casos de Imunodeficiência Comum Variável (IDCV) com expansão de linfócitos T efetores CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, com restrição oligoclonal das famílias V $\beta$  do TCR<sup>20,21</sup> e um fenótipo clínico caracterizado por esplenomegália, hiperplasia linfoide e granulomatose.<sup>20</sup>

No caso apresentado, após se verificar o reaparecimento da linfocitose T CD8<sup>+</sup> foram colocadas as hipóteses diagnósticas de L-GLG de linfócitos T, dada a exclusão de neoplasia sólida, doença autoimune e infeção VIH (**Anexo 2**). A hipótese de Imunodeficiência Primária (de início tardio) foi também considerada, uma vez que têm sido documentados recentemente fenótipos clínicos muito diversos nestas entidades.

### **Leucemia GLG de Linfócitos T**

A L-GLG de linfócitos T é uma entidade rara, constituindo menos de 1% das neoplasias hematológicas.<sup>13</sup> A L-GLG afeta igualmente ambos os sexos e é mais frequente em doentes com mais de 60 anos, ainda que estejam descritos casos em todos os grupos etários.<sup>5</sup>

A L-GLG é uma doença indolente com manifestações clínicas inespecíficas, como febre, fadiga e perda ponderal.<sup>5,6</sup> A esplenomegália é o achado semiológico mais frequente (20 a 60% dos doentes), seguido de hepatomegália (menos de 20% dos casos).<sup>5</sup> Apesar destes achados, mais de um terço dos doentes são diagnosticados com base na deteção de citopénias assintomáticas, das quais a neutropénia é a mais frequentemente encontrada e um dos principais fatores de risco associados a

mortalidade.<sup>5,7</sup> A anemia e a trombocitopénia, que ocorrem em 50% e 20% dos casos, respetivamente, são multifatoriais.<sup>5</sup> A deteção de autoanticorpos (fator reumatóide e ANA) é também um achado laboratorial característico.<sup>7</sup>

Apesar dos avanços no diagnóstico laboratorial das doenças linfoproliferativas, o diagnóstico da L-GLG é ainda um desafio. A distinção entre linfócitos malignos com fenótipo GLG (L-GLG *stricto sensu*) e de linfócitos reativos com o mesmo fenótipo (Linfocitose GLG de significado Indeterminado) é particularmente difícil.<sup>5</sup>

A demonstração de clonalidade é um critério fundamental para estabelecer o diagnóstico de L-GLG.<sup>7,22</sup> A monoclonalidade estabelece-se quando mais de 50% dos linfócitos T expressam um subtipo específico da família V $\beta$  do TCR, na análise por CF, podendo uma população apresentar características sugestivas de clonalidade se mais de 40% das células expressarem o mesmo subtipo de família V $\beta$ .<sup>5,6</sup> Ainda assim, o verdadeiro significado da monoclonalidade de células T é controverso<sup>7</sup>, sobretudo porque várias situações não neoplásicas, nomeadamente infeções virais e durante o envelhecimento, podem cursar com restrição das cadeias V $\beta$ .<sup>5,22</sup> Por esta razão, a demonstração de monoclonalidade de uma população T CD8<sup>+</sup> pode não ser suficiente para estabelecer o diagnóstico de L-GLG, sendo necessária a demonstração concomitante de aberrância fenotípica na população de linfócitos T.<sup>5-7,22</sup> O'Malley<sup>5</sup> sugere que os linfócitos T GLG reativos são CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> $\alpha\beta$ TCR<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>-</sup>, enquanto que os linfócitos T GLG neoplásicos não apresentam expressão de CD5 ou CD7 (ou apresentam expressão diminuída destes marcadores) e expressam caracteristicamente CD16 e CD57.<sup>5,6</sup> De facto, e apesar da heterogeneidade clínica, a maioria dos casos de L-GLG caracteriza-se pela expansão de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+/Dim.</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> $\alpha\beta$ TCR<sup>+</sup>, que reflete um fenótipo de células efectoras, constitutivamente ativadas e *terminalmente-diferenciadas*.<sup>1,7</sup>

A etiologia das L-GLG de linfócitos T não é conhecida, mas as suas características imunofenotípicas e a restrição do repertório do TCR encontrados sugerem que a seleção clonal não é aleatória<sup>5,7</sup>, refletindo, provavelmente, uma estimulação antigénica crónica.<sup>2</sup> Apesar dos péptidos envolvidos nesse processo não serem conhecidos, alguns dados sugerem um papel importante de algumas infeções virais (como o HTLV1), ou de doenças autoimunes (como a Artrite Reumatóide), na transformação leucémica de proliferações poli/oligoclonais de células T expandidas.<sup>5,7,23</sup> A desregulação das vias da apoptose tem sido cada vez mais implicada na patogénese da L-GLG. Os linfócitos na L-GLG são resistentes à apoptose mediada pela via Fas/FasL e apresentam ativação de



vias de sobrevivência celular, nomeadamente a via RAS e PI3K-AKT.<sup>5,7,23,24</sup> Koskela *et al.*<sup>23</sup> mostrou que cerca de 40% dos doentes com L-GLG apresentam mutações no gene STAT3, responsável pela prevenção da apoptose e consequente proliferação de linfócitos T. Neste trabalho a utilização de oligonucleótidos *nonsense* com o intuito de reduzir a expressão do gene STAT3 restabeleceu a sensibilidade ao Fas nas células da L-GLG.<sup>23</sup> É provável que as propriedades antiapoptóticas manifestadas pelos linfócitos da L-GLG sejam consequência de mutações somáticas adquiridas durante o processo de transformação maligna.<sup>5,23</sup>

No caso apresentado, a presença de sintomas constitucionais acompanhados de hepatomegália e a presença de uma expansão oligoclonal de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (**Figura 4**) com imunofenótipo CD3<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, embora sem fenótipo *terminalmente-diferenciado* (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), sugerem a existência de uma Linfocitose GLG de Significado Indeterminado. Contudo a presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> positivos para CD3, CD5, CD57, TIA-1 e Granzima na medula óssea é um dado que apoia a hipótese de L-GLG.<sup>7,22</sup> A existência de granulomas hepáticos nesta entidade não está estabelecida, mas tal como na SILD, a L-GLG pode acompanhar de infiltração tecidular por linfócitos GLG.<sup>5-7</sup> O dado que fica por explicar com a consideração desta hipótese diagnóstica é a ausência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> *naïve* e de linfócitos B CD19<sup>+</sup>. Contudo, não são conhecidos estudos que tenham caracterizado as populações linfocitárias de forma sistemática nestes doentes.

### **Imunodeficiência Combinada de Início Tardio e Fenótipo Imunológico de Risco**

A Imunodeficiência Combinada de Início Tardio (IDCIT) é uma variante da IDCV descrita recentemente em doentes adultos com infeções oportunistas recorrentes e linfopenia T CD4<sup>+</sup>.<sup>21,25</sup> Clinicamente os doentes com IDCIT distinguem-se dos doentes com IDCV por apresentarem maior incidência de esplenomegália, manifestações gastrointestinais (enteropatia semelhante à verificada na Doença Inflamatória Intestinal e/ou semelhante à verificada na Doença Celíaca<sup>25</sup>), doenças linfoproliferativas e infiltração tecidular com formação de granulomas.<sup>21</sup>

A diminuição absoluta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> constitui a principal alteração imunológica especialmente nas células com fenótipo *naïve*, diminuídas ou ausentes em 71% dos casos de IDCIT (vs. 37% na IDCV).<sup>21</sup> Em alguns casos são também detetadas reduções

das populações linfocitárias T CD8<sup>+</sup>, principalmente no compartimento naïve, e B CD19<sup>+</sup>.<sup>21,25</sup>

O fenótipo imunológico da doente descrita neste caso é concordante com uma IDCIT, contudo, nesta entidade não está descrita a infiltração tecidual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> positivos para CD3, CD5, CD8, CD57, TIA-1 e Granzima, o que em conjunto com a ausência de hipogamaglobulinémia e infecções oportunistas recorrentes torna esta hipótese menos provável.

Interessantemente, a ausência de células T naïve não é um achado patognomónico de uma Imunodeficiência, o que pode explicar os achados encontrados nesta doente sem invalidar a hipótese de L-GLG. A homeostasia do compartimento linfocitário T no sangue periférico é mantida pelo *output* tímico de células T naïve e pela proliferação e apoptose das células T na periferia.<sup>18</sup> Quando ocorre uma expansão de células T diferenciadas na periferia pode verificar-se a contração do compartimento naïve, como descrito no processo de envelhecimento.<sup>1,3</sup> No envelhecimento verifica-se uma expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> *terminalmente-diferenciados* (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>) com inversão do ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e diminuição de linfócitos T naïve e de linfócitos B. Este fenótipo imunológico, designado Fenótipo Imunológico de Risco, é ainda pouco conhecido, mas tem sido relacionado imunopatogenicamente com a infeção latente pelo CMV e/ou EBV e associa-se a uma maior mortalidade, pelo que pode representar um processo com significado biológico.<sup>1,3,9</sup>

## CONCLUSÃO

Este caso ilustra a complexidade da investigação etiológica da linfocitose T CD8<sup>+</sup> e demonstra a necessidade de, em certos contextos clínicos, recorrer a metodologias experimentais que não constituem rotina.

Do ponto de vista clínico, os dados disponíveis favorecem a hipótese de uma doença linfoproliferativa indolente de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Apesar dos critérios de diagnóstico de L-GLG não serem completamente preenchidos neste caso não se pode excluir que este quadro clínico represente um estágio pré-leucémico, isto é, Linfocitose T CD8<sup>+</sup> de Significado Indeterminado.

A caracterização de populações linfocitárias neste caso pode também ser enquadrada numa Imunodeficiência Primária, embora seja mais difícil provar, neste contexto, esta hipótese. Independentemente dos estudos futuros que serão necessários na investigação adicional deste caso, o seu estudo favorece uma hipótese interessante do ponto de vista imunológico. De facto, a caracterização das populações linfocitárias aponta para a existência de um defeito intrínseco das células CD8<sup>+</sup> na sua diferenciação. Se este defeito corresponde a um fenómeno patogénico da progressão para a L-GLG ou a um defeito já identificado em Imunodeficiências Primárias mas com um fenótipo clínico distinto são hipóteses em aberto.

A geração de hipóteses científicas, como as aqui ilustradas, é um dos excelentes exemplos da importância do estudo de casos clínicos individuais.

## **AGRADECIMENTOS**

Começo por agradecer ao Dr. Válder Fonseca. Em primeiro lugar, por aceitar orientar o meu trabalho final de mestrado. Em segundo, por toda a disponibilidade e dedicação que demonstrou desde o início desta jornada. Por último, mas não menos importante, muito obrigado pela força e incentivo que tornaram a realização deste trabalho possível.

À Professora Doutora Ana Espada de Sousa, e ao Laboratório de Imunologia Clínica do Instituto de Medicina Molecular / Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade para a realização da caracterização das populações linfocitárias deste caso e ainda pelo seu imprescindível contributo na discussão clínica deste caso.

À Dra. Cristina Ferreira pela sua colaboração na análise histológica das várias amostras e pela amabilidade na cedência da respetiva documentação fotográfica.

Ao Professor Doutor Rui Victorino, Diretor do Serviço de Medicina II do Hospital de Santa Maria, por ter permitido a elaboração desta tese no seu serviço.

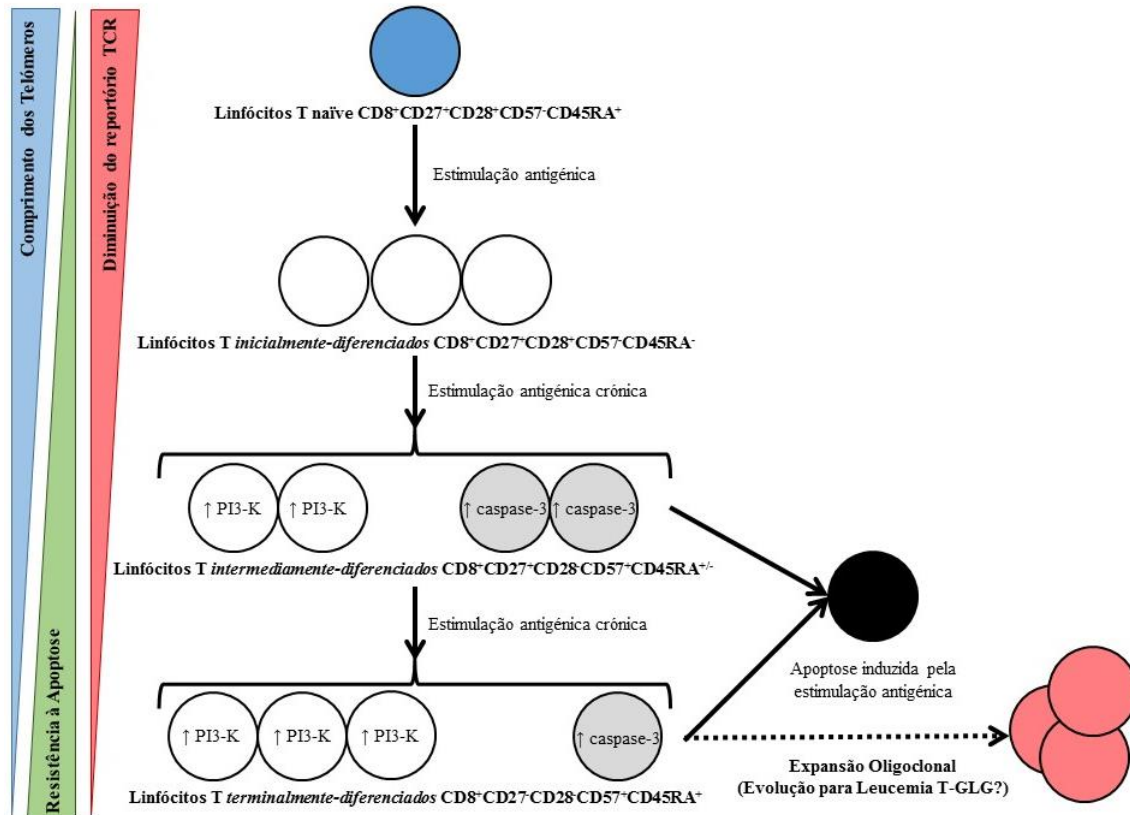
## BIBLIOGRAFIA

1. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+CD28- and CD8+CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011;134(1):17-32.
2. Ghrenassia E, Roulin L, Aline-Fardin A, et al. The spectrum of chronic CD8+ T-cell expansions: Clinical features in 14 patients. *PLoS One*. 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0091505.
3. Simpson RJ. Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise “make space”? *Exerc Sport Sci Rev*. 2011;39(1):23-33. doi:10.1097/JES.0b013e318201f39d.
4. Hakim FT, Flomerfelt FA, Boyiadzis M, Gress RE. Aging, immunity and cancer. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(2):151-156. doi:10.1016/j.coi.2004.01.009.
5. O'Malley DP. T-cell large granular leukemia and related proliferations. In: *American Journal of Clinical Pathology*. Vol 127. ; 2007:850-859. doi:10.1309/A8FHDA0VVRJ05GJP.
6. Lundell R, Hartung L, Hill S, Perkins SL, Bahler DW. T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(6):937-946. doi:10.1309/PH7X-78HF-4FW4-PRKW.
7. Lamy T, Loughran TP. How I treat LGL leukemia. *Blood*. 2011;117(10):2764-2774. doi:10.1182/blood-2010-07-296962.
8. Ghrenassia E, Martis N, Boyer J, Burel-Vandenbos F, Mekinian A, Coppo P. The diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome (DILS): A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015;59:19-25. doi:10.1016/j.jaut.2015.01.010.
9. Plonquet a, Bastuji-Garin S, Tahmasebi F, et al. Immune risk phenotype is associated with nosocomial lung infections in elderly in-patients. *Immun Ageing*. 2011;8(1):8. doi:10.1186/1742-4933-8-8.
10. Hutchinson J. Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ER. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):736-755. doi:10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99.
11. Spagnolo P, Luppi F, Roversi P, Cerri S, Fabbri LM, Richeldi L. Sarcoidosis: Challenging diagnostic aspects of an old disease. *Am J Med*. 2012;125(2):118-

125. doi:10.1016/j.amjmed.2011.06.003.
12. Judson MA. Extrapulmonary sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007;28(1):83-101. doi:10.1055/s-2007-970335.
  13. Kasper D, Fauci A, Haruser S, D L, Jameson J., J L. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. McGraw-Hill Education; 2015.
  14. Karagiannidis A, Karavalaki M, Koulaouzidis A, Ed VC. Artemisa Hepatic sarcoidosis. 2006;5(4):4-9.
  15. Jovicic I, Popovic D, Toncev L, et al. Isolated hepatic sarcoidosis. *Vojnosanit Pregl*. 2014;71(4):399-403. doi:10.2298/VSP1404399J.
  16. Kita S, Tsuda T, Sugisaki K, Miyazaki E, Matsumoto T. Characterization of distribution of T lymphocyte subsets and activated T lymphocytes infiltrating into sarcoid lesions. *Intern Med*. 1995;34(9):847-855.
  17. Inbal A, Avidor I, Nemesh L, Shaklai M. Persistent lymphocytosis: an unusual feature in sarcoidosis. *Acta Haematol*. 1985;74(3):184-185.
  18. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol*. 2007;178(6):3932-3943. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3932.
  19. Macintyre E a, Linch DC. Lymphocytosis: is it leukaemia and when to treat. *Postgrad Med J*. 1988;64(747):42-47. doi:10.1136/pgmj.64.747.42.
  20. Viallard JF, Ruiz C, Guillet M, Pellegrin JL, Moreau JF. Perturbations of the CD8+ T-cell repertoire in CVID patients with complications. *Results Immunol*. 2013;3:122-128. doi:10.1016/j.rinim.2013.05.004.
  21. Malphettes M, Gérard L, Carmagnat M, et al. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clin Infect Dis*. 2009;49(9):1329-1338. doi:10.1086/606059.
  22. Morice WG, Kurtin PJ, Leibson PJ, Tefferi A, Hanson CA. Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;120(6):1026-1036. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04201.x.
  23. Koskela HLM, Eldfors S, Ellonen P, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(20):1905-1913. doi:10.1056/NEJMoa1114885.
  24. Olson T, Sc B, Jalkanen SE, et al. Mutations in Large Granular Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2015:1905-1913.

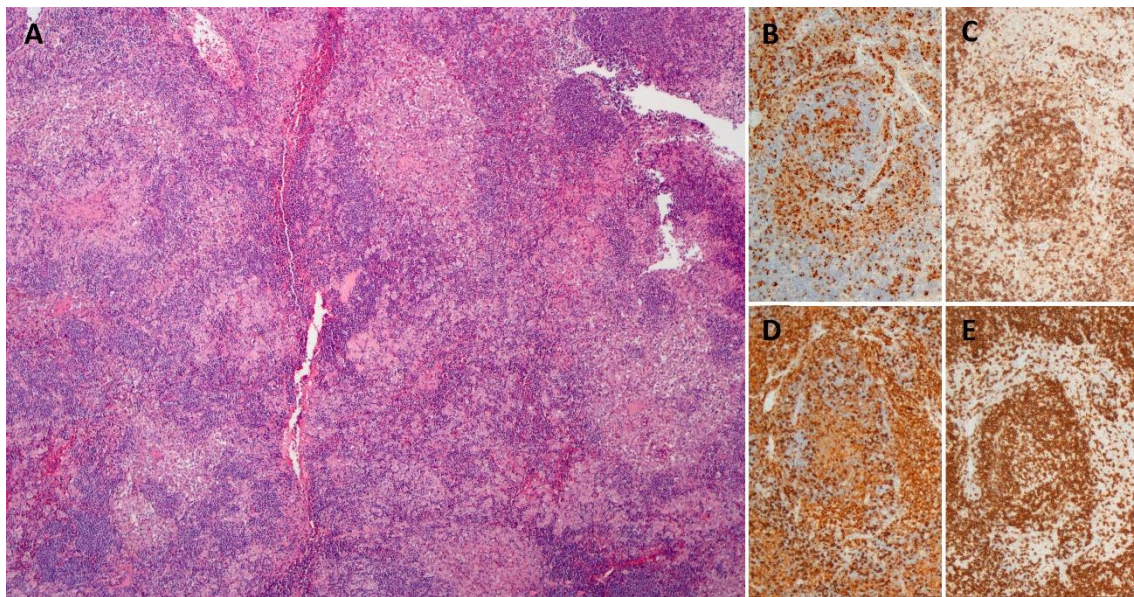
25. Papakonstantinou I, Baraboutis IG, Karnesis L. Late Onset Combined Immunodeficiency Presenting with Recurrent *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia. *Case Rep Med.* 2014;2014:801805. doi:10.1155/2014/801805.

## FIGURAS

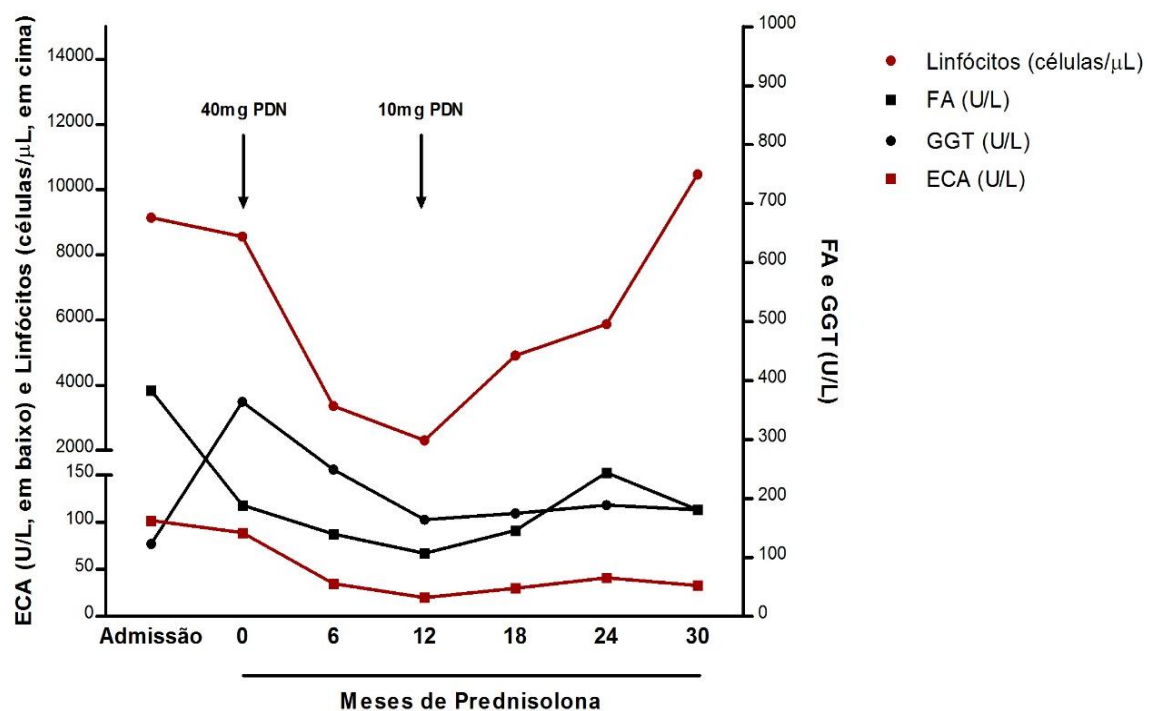


**Figura 1. Vias de diferenciação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> durante a estimulação antigénica crónica.** Adaptado de Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T cells and their role in health and disease. Immunology. 2011;134(1):17-32.

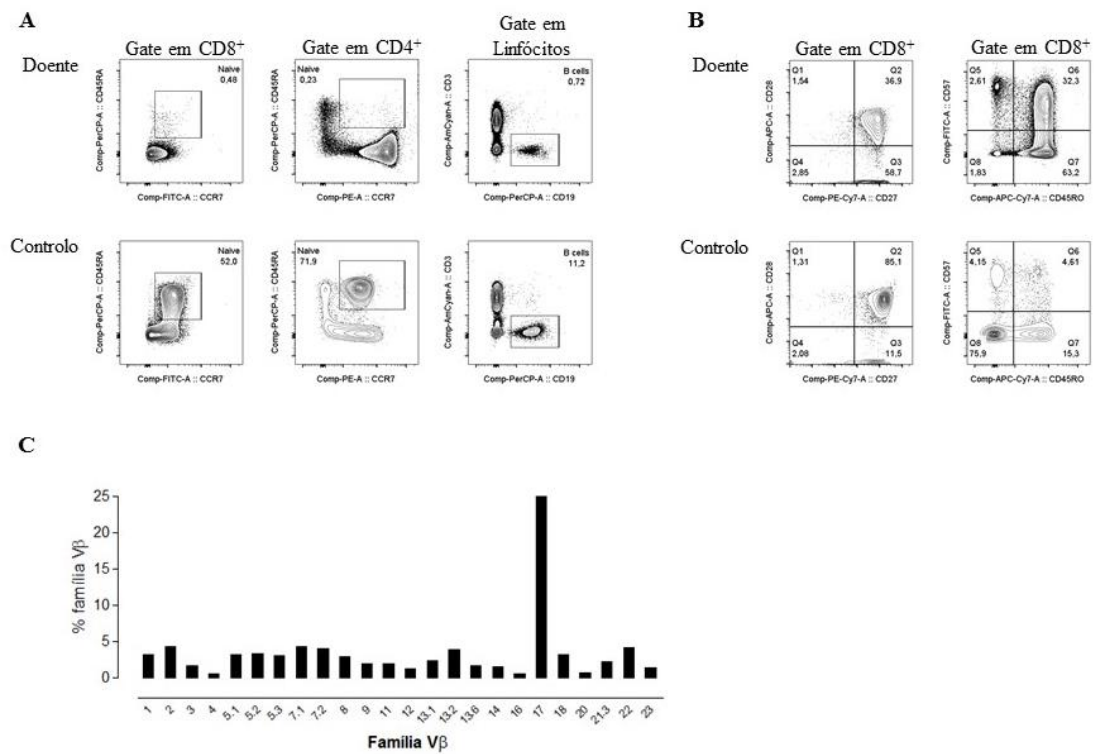




**Figura 2. Granulomas hepáticos e caracterização imunohistoquímica das populações linfocitárias (A: HE, B – E: imunohistoquímica).** Múltiplos granulomas sarcoides, compostos por histiócitos epitelioides ( $CD68^{+}$ , B) e células gigantes multinucleadas com denso infiltrado linfocitário circundante com fenótipo efetor ( $CD45RO^{+}$ , C) e presença de linfócitos  $CD4^{+}$  e  $CD8^{+}$  no interior da estrutura granulomatosa (D e E).



**Figura 3. Evolução clínica e analítica ao longo do seguimento clínico.** Após o início da corticoterapia verificou-se uma normalização dos valores da ECA e da linfocitose absoluta. Após o início do desmame da corticoterapia verificou-se o reaparecimento da linfocitose absoluta, sem, contudo, se verificar um aumento dos valores de ECA.



**Figura 4. Caracterização das populações linfocitárias.** A) Percentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> com fenótipo *naïve*; B) Percentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que expressam marcadores associados à exaustão celular. C) Análise da distribuição das famílias Vβ do TCR dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico, por citometria de fluxo.

## ANEXO 1: Avaliação analítica inicial

Parâmetro	Resultado
Hemoglobina (g/dL)	10,9
Hematócrito (%)	32,3
VGM (fL)	72,5
HbGM (pg)	24,3
CMHG (g/dL)	33,6
RDW (%)	15,8
Eritroblastos (/100cLeuc.)	
Leucocitos, contagem ( $10^9/L$ )	12,4
Neutrófilos (%)	20,9/2,59
Eosinófilos (%)	0,9/0,11
Basófilos (%)	1,0/0,12
Linfócitos (%)	73,7/9,14
Monócitos (%)	3,5/0,43
Plaquetas, contagem ( $10^9/L$ )	383
Ferro (ug/dL)	36,0
CTFF (ug/dL)	542
Saturação da Transferrina (%)	7
Ferritina (ng/dL)	75,6

Parâmetro	Resultado
INR	0,88
APTT (seg)	26,3/29,0
Ureia (mg/dL)	31
Creatinina (mg/dL)	0,81
Sódio (mEq/L)	142
Potássio (mEq/L)	4,5
Cálcio (mg/dL)	10,5
Albumina	4,1
ALT (U/L)	24
AST (U/L)	50
GGT( U/L)	123
Fosfatase alcalina (ALP) (U/L)	383
Bilirrubina total (mg/dL)	0,46
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,19
VS	18
TSH	2,69
ft4	2,70
LDH (U/L)	693

## ANEXO 2: Investigação etiológica.

Parâmetro	Resultado
Alfa 1-antitripsina (mg/dL)	175
Ceruloplasmina (mg/dL)	101
ECA (U/L)	102
Beta-2-microglobulina	6,09
CMV (IgM)	Negativo
EBV (IgM)	Negativo
VIH 1 e 2	Negativo
HTLV 1 e 2	Negativo
HAV (IgM)	Negativo
HVB	Negativo
HVC	Negativo
HHV8	Negativo
Cultura BK	Negativo
IGRA	Negativo
Toxoplasmose (IgM)	Negativo
TPHA	Negativo
C. burnetii (Febre Q)	Negativo
Brucelose	Negativo
CMV (DNA)	Negativo
EBV (DNA)	Negativo

Parâmetro	Resultado
ANA	Negativo
ANA (IIF)	Negativo
Anti-dsDNA	Negativo
Anti-LKM	Negativo
Anti-SSA/Ro	Negativo
Anti-SSB/La	Negativo
Anti-Sm	Negativo
Anti-RNP	Negativo
AMA	Negativo
ASMA	Negativo
Anti-Jo-1	Negativo
Anti-Scl-7	Negativo
RA teste	Negativo
Anticoagulante lúpico	Negativo
Anticorpos anti-tiroideus	Negativos
C3	170
C4	32
CH50	70,1